

Braunschweigische  
Wissenschaftliche Gesellschaft

# Jahrbuch 2016

Sonderdruck  
Seiten 143–156



J. CRAMER Verlag • Braunschweig  
2017

## **Viren und Legionellen im Wasserkreislauf\***

KARL-HEINZ ROSENWINKEL & REGINA NOGUEIRA

Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik Hannover,  
Leibniz Universität Hannover, Welfenplatz 1, D-30167 Hannover  
E-Mail: rosenwinkel@isah.uni-hannover.de

### **I. Einleitung**

Der Eintrag von humanpathogenen Viren wie Noro-, Rota-, Hepatitis- und Adenoviren in den Wasserkreislauf erfolgt über defekte Abwasserleitungen und Kläranlagenabläufe. In Deutschland werden ca. 70% der Trinkwassergewinnung über das Grundwasser und Uferfiltration abgedeckt und der verbleibende Rest über Oberflächenwasser. Zwar besteht kein akuter Handlungsbedarf (Szewzyk et al., 2006), es kann jedoch zu Problemen bei der Aufbereitung von Trinkwasser aus Oberflächengewässern sowie bei der Nutzung als Badegewässer kommen.

Während Viren direkt mit dem Trinkwasser aufgenommen werden können, wird eine Infektion mit Legionellen durch die Aufnahme von belasteten Aerosolen hervorgerufen. Seit 2013 ist auch diese Gefährdung im Zusammenhang mit der Einleitung von gereinigten Abwässern in Gewässer und daraus entnommenen Kühlwässern mit Aerosolbildung deutlich geworden. In diesem Beitrag sollen Vorkommen und Möglichkeiten der Bekämpfung dieser Erreger aufgezeigt werden.

### **II. Viren**

Mit der Virenproblematik hat sich ein DFG – Gemeinschaftsprojekt “Pathogenic viruses in water – detection, transport and elimination” mit fünf unterschiedlichen Projektpartnern beschäftigt. Die Projektpartner waren im Einzelnen: das Helmholtz Zentrum München (HZM), Umweltbundesamt Berlin (UBA), Universität Bonn (UB), TU München (TUM) und die Leibniz Universität Hannover (LUH). Ziel eines Teilprojektes des ISAH war die Bilanzierung der Vireneliminations-

---

\* Der Vortrag wurde am 11.11.2016 vor der Plenarversammlung der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft gehalten.

effizienz einer Kläranlage und Identifikation der wesentlich Einflussgrößen auf die Inaktivierung der Viren (z.B. Schlammalter, Schlammbelastung, Temperatur etc.). Die Untersuchungen wurden durch die Bestimmung der nichthumanpathogenen somatischen Coliphagen in einer Kläranlage durchgeführt. Zusätzliche Untersuchungen im Batchtest wurden durch den Einsatz von  $\phi$ X174, einem Modellorganismus für humanpathogene Enteroviren und typischen Vertreter der somatischen Coliphagen, durchgeführt. Die Eliminationsrate wurde durch die Auswertung der PFU (PlaqueFormingUnits) und der RT-PCR vor und nach der Abwasserreinigung quantifiziert. Auf Basis dieser Untersuchungen wurde dann ein Virus-Tool für das Activated Sludge Model No. 3 (ASM 3) erstellt.

### **Untersuchungen zur Virenelimination in einer kommunalen Kläranlage**

Das Ziel dieser Untersuchung war es, durch die Beobachtung des Indikators für humanpathogene Enteroviren – somatische Coliphagen –, die Reduktionsschritte in der Kläranlage zu identifizieren und zu quantifizieren. Dabei wurden im Ablauf der Vorklärung, der Belebung und der Nachklärung einer Kläranlage, sowie Zu- und Ablauf Faulbehälter (mesophil) Stichproben gezogen und die Konzentration somatischer Coliphagen mit Hilfe der Weichagarschichttechnik bestimmt. Dazu wurden die Proben mit einem Nährmedium, welches den Wirt des Indikators – *Escherichia coli* – enthält, vermischt. Dieser Suspension wurden dann warmen Weichagar zugesetzt und sofort auf eine Agarplatte gegeben. Nach einer Inkubation bei ca. 37°C wurden dann die im Bakterienrasen sichtbaren Plaques (siehe Abbildung 1) ausgezählt. Da man davon ausgeht, dass jeder Plaque durch einen Viruspartikel verursacht wird, kann man durch Hochrechnung auf die Konzentration der somatischen Coliphagen in der Probe schließen. Diese Untersuchungen wurden sowohl im Winter und als auch im Sommer durchgeführt um einen Einfluss der Temperatur auf die Eliminationsleistung ermitteln zu können.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In der Vorklärung ist keine Elimination der somatische Coliphagen nachgewiesen worden und in der Nachklärung im Wesentlichen auch nicht, nur um Sommer konnte dort zeitweise eine erhöhte Effektivität nachgewiesen werden.
- Der wesentliche Mechanismus der Elimination von somatische Coliphagen ist aber die Adsorption an den Belebtschlamm. Etwa 98% der somatische Coliphagen binden an den Schlamm. Die ungebundenen Phagen in der Flüssigphase der Belebung wiederum sind in der Nachklärung nachweisbar.
- Im Faulbehälter konnten die somatische Coliphagen um ca. 2 log-Stufen reduziert werden.

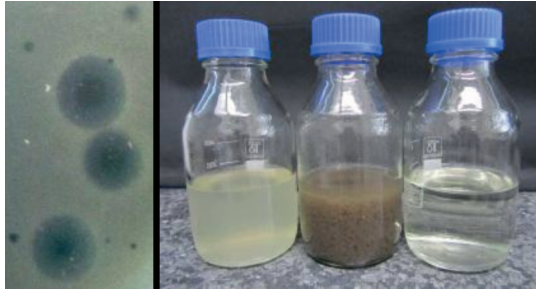


Abbildung 1: Plaques von somatischen Coliphagen (links), Proben aus der Vorklärung, Belebungs- und Nachklärung.

### Adsorption und Inaktivierung

Um die Adsorptionskinetiken zwischen Viruspartikel und Belebtschlammoberfläche bestimmen zu können, wurden Batchtests durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter bezüglich ihres Einflusses auf die Adsorption untersucht:

1. TS-Gehalt
2. Ausgangskonzentration des somatischen Coliphagen  $\phi$ X174
3. CSB

Für alle Untersuchungen wurde Schlamm aus der Belebungs einer Kläranlage entnommen und in Reaktoren abgefüllt. Anschließend wurden die Reaktoren mit dem Modellindikator  $\phi$ X174, einem somatischen Coliphagen, gespikt, und ca. 2-8h regelmäßig beprobt. Für die Untersuchung des TS-Gehaltes (24.) wurde dieser durch Aufkonzentration oder Verdünnung variiert, während die zugegebene Konzentration an  $\phi$ X174 in allen Reaktoren am Anfang gleich war. Im Gegenzug dazu wurde in den Batchtest mit variablen Ausgangskonzentrationen des somatischen Coliphagen der TS-Gehalt konstant gehalten. Um eine Substratkonzurrenz durch CSB und damit einen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten des somatischen Coliphagen  $\phi$ X174 ausschließen zu können, wurde bei dem CSB- Batchtest Glukose in sehr hohen Konzentrationen zugegeben. Die zugegebene Konzentration an  $\phi$ X174 entsprach dabei den Konzentrationen von den TS-Batchtests [24].

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden:

1. TS-Gehalte zwischen 2–7 g/l haben keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der adsorbierten somatischen Coliphagen.

2. Die Ausgangskonzentration von somatischen Coliphagen beeinflusst die Adsorptionsgeschwindigkeit.
3. Die Zugabe von CSB in Form von hochkonzentrierter Glukose keinen Effekt auf die Virenadsorption hat.

Um ein genaueres Bild von den Vorgängen im Belebtschlamm zu haben, wurden weitere Batchtests durchgeführt. Diese sollten klären, ob und in welchem Zeitraum eine Inaktivierung der somatischen Coliphagen im Belebtschlamm stattfindet. Dafür wurde der Schlamm in den Reaktoren im Gegensatz zu den ersten Versuchen, nicht mit  $\phi$ X174 gespikt, sondern die natürlichen Belastung des Schlammes mit somatischen Coliphagen nicht verändert. Diese Batchtests wurden in einem Zeitraum von ca. 60d untersucht, wobei in regelmäßigen Abständen künstliches Substrat zum Erhalt der Bakterien sowie bei Bedarf Natronlauge zum Einstellen des pH-Wertes zugegeben wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben:

1. Die Inaktivierung ist ein sehr langsamer Prozess und die freien Viren werden am effektivsten inaktiviert, gebundene nur zu einem sehr geringen Teil.
2. Die Temperatur ist ein wichtiger Faktor bei der Inaktivierung von Viren. Bei 12°C ist die Inaktivierung deutlich weniger effektiv als bei Raumtemperatur.

### **Modellentwicklung**

Aus den gewonnen Erkenntnissen wurde die Virenelimination als Virus-Tool auf Grundlage von ASM3 implementiert. Die Fraktion der adsorbierten Viren und der freien Viren in der Wasserphase wurden als zwei zusätzliche Stoffgruppen definiert. Diesen beiden Fraktionen werden keine Stoffeigenschaften zugeordnet, sie besitzen keine Masse und werden als Partikelanzahl pro Volumeneinheit im Modell geführt. Zudem unterliegen die beiden Fraktionen keinem Abbau. Eins der Eliminierungsprozesse ist die Adsorption und anschließende Ausschleusung über den Schlammabzug. Hierfür wird zunächst der eigentliche Prozess der Adsorption von Viren an die Schlammflocke definiert. Die Adsorption wird als linearer Prozess über eine konstante Adsorptionsrate definiert.

Die Laboruntersuchungen zur Virenelimination haben gezeigt, dass es neben der Adsorption auch eine Verminderung der Gesamtzahl der Viren stattfindet. Dieser Prozess der Inaktivierung wirkt sich sowohl auf die freien Viren in der Wasserphase als auch auf die adsorbierten Viren, wobei Geschwindigkeit der Inaktivierung in der Wasserphase um Vielfaches höher ist, aus.

### III. Legionellen

Seit dem ersten nachgewiesenen Ausbruch der Legionärskrankheit im Jahre 1976 [1] sind Legionellen ein bekanntes Problem im Trinkwasserbereich. Der Haupterreger der Legionärskrankheit ist *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pneumophila* SG1, [2]), der durch die Inhalation von Aerosolen in den menschlichen Organismus gelangt. Unter Laborbedingungen sind Legionellen sehr anspruchsvoll und eher langsam wachsende Bakterien. Sie benötigen bestimmte Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle, insbesondere Arginin, Cystein, Methionin, Serin, Threonin und Valin [3] und wachsen bevorzugt zwischen 25°C und 42°C (Optimum: 37°C; [4]). *L. pneumophila* kann sich auch intrazellulär in verschiedenen Amöbenarten und Wimperntierchen, wie beispielsweise in *Acanthamoeba castellanii* [5], *Acanthamoeba polyphaga* [6], *Hartmannella vermiformis* [7] und *Naegleria fowleri* [8] vermehren. Nach erfolgreicher Vermehrung in Amöben weist *L. pneumophila* sogar eine erhöhte Resistenz gegenüber Oxidationsmitteln auf [9].

Auf Grund dieser hohen Umweltresistenz kommt es immer wieder zu trinkwasserassoziierten Legionellenausbrüchen durch befallene technische Anlagen (z.B. Duschen, Klimaanlage, Kühltürme; [1, 10, 11]). Dies führte auch dazu, dass diverse Vorschriften und Merkblätter zur Vermeidung von Legionellen in diesen Anlagen entwickelt worden sind, z.B. das DVGW-Arbeitsblatt W 551 [12], und 2011 auch eine Ergänzung in der Trinkwasserverordnung [13] vorgenommen wurde. Im Gegensatz dazu sind aber bisher im Zusammenhang mit Abwasserreinigungsanlagen weltweit nur wenige Einzelfälle beschrieben und auch keine Vorschriften zur Vermeidung entwickelt worden. Die dokumentierten Ausbrüche sind in Industrieabwasserbehandlungsanlagen (Papier, Raffinerie und Lebensmittel; [14], [15], [16]) aufgetreten. Die Verbreitung der Legionellen erfolgte auch hier durch legionellenhaltige Aerosole, die zum Beispiel bei der Belüftung oder durch Leckagen oder durch die Nutzung von Rückkühlwerken entstehen. Insbesondere belüftete Belebungsbecken wiesen in diesen Fällen hohe Konzentrationen an Legionellen (bis zu 8,9 logKBE/100ml; KBE: Koloniebildende Einheiten) auf [14]. Die bisherigen Gegenmaßnahmen beinhalteten zumeist eine vollständige Außerbetriebnahme der betroffenen Anlagen oder einen Umbau zu anaeroben Vorbehandlungsstufen und eine hygienische Reinigung der Kühltürme. Wie es aber zu der Vermehrung der Legionellen kam oder wie man präventiv diese verhindern könnte, wurde bisher kaum hinterfragt.

Ein erneuter Legionellenausbruch im August 2013 in Warstein, bei dem es 160 Erkrankungs- und Verdachtsfälle und 2 Todesfälle gab, war die Veranlassung für weitergehende Untersuchungen [17].

Mit den hier beschriebenen Untersuchungen sollten Maßnahmen zur gezielten Reduzierung und/oder Unterdrückung einer Wiederansiedlung von Legionellen

im Belebtschlamm ermittelt werden. In den Versuchen wurden u.a. die Reduktion von Legionellen durch die Anpassung von Betriebsparametern (Temperatur, Schlammalter, Substrat) und die Inaktivierung bzw. Abtötung durch verschiedene chemische Desinfektionsverfahren (z.B. Mikrosilber, pH-Veränderung, ClO<sub>2</sub>) untersucht. Als innovativer, physikalischer Ansatz wurde eine Teilstrombehandlung mit Ultraschall versuchstechnisch erprobt. Auf diese Weise sollten die Amöben als mögliche Wirtszellen und damit die Freisetzung der Legionellen in die Wasserphase zur gezielten Elimination in einem nachfolgenden Schritt erreicht werden. In einer anderen Studie [5] wurden mit Hilfe des Ultraschalls bereits vielversprechende Ergebnisse in Wasserversorgungssystemen erzielt.

Darüber hinaus zeigten die Erfahrungen im Fall des Legionellenausbruches in Warstein, dass mit der bisherigen Kultivierungsmethode keine ausreichend sichere (in Bezug auf Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit) und schnelle Quantifizierung von Legionellen im Belebtschlamm möglich ist. Daher umfasste das Forschungsvorhaben außerdem eine Abstimmung der Analytik basierend auf der Standardmethode sowie die Erprobung und Weiterentwicklung alternativer Nachweisverfahren wie beispielsweise die qPCR (quantitative Polymerasekettenreaktion) und FISH (Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung), die hier aber nicht weiter im Detail ausgeführt werden sollen.

### **Wachstumsverhalten von Legionellen im Abwasser**

In den kontinuierlichen Versuchen konnte festgestellt werden, dass Veränderungen von Temperatur und Substrat sich unterschiedlich auf *Legionella* spp. und *L. pneumophila* auswirken. Bei Temperaturen um 35°C und einer guten Substratversorgung (proteinhaltiges Substrat wie z.B. Hefekonzentrat, siehe Abbildung 2a), zeigte *L. pneumophila* einen deutlichen Wachstumsvorteil im Vergleich zu *Legionella* spp..

In einem anderen Versuch konnte eine sehr hohe Wachstumsrate nachgewiesen werden ( $\mu_{\max}$  ca. 3,85 d<sup>-1</sup>, Abbildung 2 b), aber nach wenigen Tagen konnte man dann einen Rückgang der Legionellenkonzentration registrieren. Welcher Mechanismus dafür verantwortlich ist und bei welcher Temperatur dieser Wachstumsvorteil beginnt, konnte in diesem Projekt nicht abschließend geklärt werden. Im Allgemeinen war bei Temperaturen unter 25°C die Wachstumsrate für *L. pneumophila* niedrig. Die Konzentration an *Legionella* spp. hingegen zeigte bei diesen Temperaturen und ausreichend Substrat sogar teilweise einen Anstieg auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich im Schlamm auch Legionellen bei Temperaturen unter 25°C entwickeln können. Inwiefern diese gesundheitsrelevant sind und welchen Einfluss sie auf das Wachstum von *L. pneumophila* haben, bleibt ebenso wie die Bestimmung der kinetischen Parameter für diese Gruppe noch abzuklären. Eine dieser Legionellenarten könnte die kaum beschriebene Art *Legionella londiniensis* (*L. londiniensis*) sein, die immer wie-

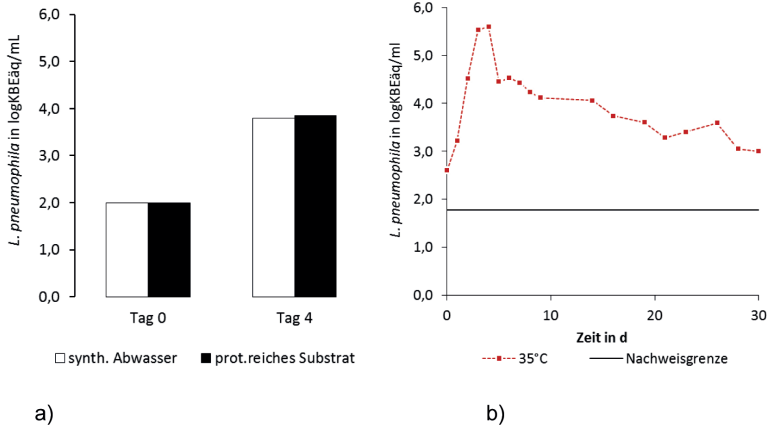


Abbildung: 2 a) Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* bei 35°C in Belebtschlamm und mit verschiedenen Substraten: synthetisches Abwasser (mit Fleischextrakt) und proteinreiches Substrat (mit Hefezellen) b) Bestimmung der maximalen Wachstumsrate von *L. pneumophila* in Belebtschlamm bei einer Beschickung mit proteinreichem Substrat bei 35°C.

der im Belebtschlamm der KA Warstein nachgewiesen wurden. Wenn man die Faktoren identifizieren könnte, die *L. londiniensis* einen Wachstumsvorteil gegenüber *L. pneumophila* verschaffen würden, wäre eine Verdrängung des Humanpathogens durch diese vermutlich ungefährliche Legionellenart als weitere Gegenmaßnahme denkbar. Durch Nahrungskonkurrenz und Sekretion von Störsubstanzen können aber auch andere Bakterien im belebten Schlamm das Wachstum der Legionellen negativ beeinflussen [18].

Innerhalb des Projektes konnte mit Hilfe von lichtmikroskopischen Aufnahmen und FISH-Untersuchungen im Belebtschlamm neben den bekannten Legionellenwirten z.B. *Naegleria* sp., *Hartmannella* sp. auch andere Arten identifiziert werden (Ciliaten, siehe Abbildung 3 a) FISH: Infektion eines Ciliaten (grün, cf. *Euplotes* sp.) mit *Legionella* spp. (rot) (Bildquelle: Dr.-Ing. Corinna Lorey, ISAH, 2014) a) FISH: Infektion eines Ciliaten (grün, cf. *Euplotes* sp.) mit *Legionella* spp. (rot) (Bildquelle: Dr.-Ing. Corinna Lorey, ISAH, 2014) Bild 3 a). Außerdem konnten bei 35°C zum Teil auch Korrelationen zwischen dem Vorkommen von Nacktamoeben und *L. pneumophila* (Abbildung 3 b) nachgewiesen werden.

Somit scheint ein breites Wirtsspektrum eine weitere Überlebensstrategie der Legionellen im Belebtschlamm zu sein.

Als weitere Möglichkeit zur Detektion wachstumsfördernder Substrate wurde ein Aminosäurescreening durchgeführt. Die Ergebnisse sind in untenstehender



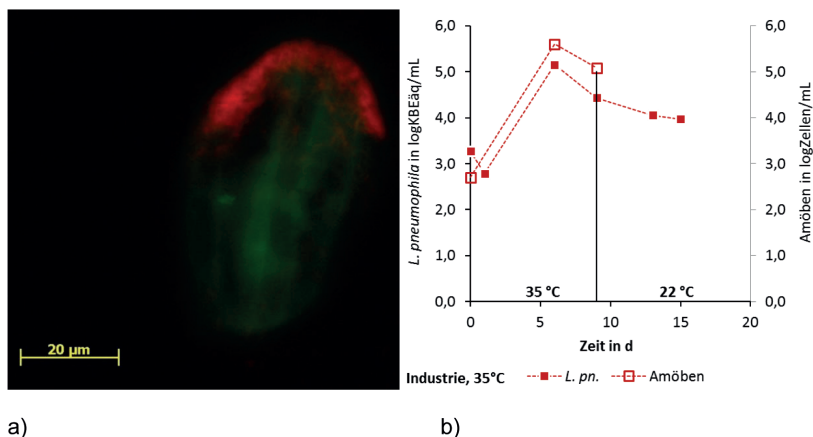


Abbildung 3: a) FISH: Infektion eines Ciliaten (unten, cf. Euplotes sp.) mit Legionella spp. (oben) (Bildquelle: Dr.-Ing. Corinna Lorey, ISAH, 2014) b) Korrelation im Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* und Amöben bei 35°C (nach 9 Tagen wurde die Temperatur auf 22°C umgestellt).

Screening Top 5 [mg/L N]	Glu	Thr	Ala	Val	Phe	Ile	Leu	Lys	ΣTop5	Leg. spp. [KBE <sub>eq</sub> /ml]
a. Industrie	3,4		4,5	2,9			2,6	3,8	17,2	<400
b. Industrie mit UV	3,9		5,3	3,1			2,8	3,8	18,8	<400
c. Ablauf Kanal	1,6		1,2		0,5		0,7	2,5	6,4	<400
d. Belebtschlamm			8,3	4,2		3,1	5,1	2,7	23,4	1,08·10 <sup>5</sup>
Kontrolle_Belebtschlamm	1,3	0,9	1,3	0,9				2,0	6,5	1,92·10 <sup>3</sup>

Erläuterung:

Glu = Glutaminsäure  
Thr = Threonin

Ala = Alanin  
Val = Valin

Phe = Phenylalanin  
Ile = Isoleucin

Leu = Leucin  
Lys = Lysin

Tabelle 1: Aminosäuren-Screening zur Identifikation von wachstumsfördernden Substraten.

Screening Top 5 [mg/L N]	KN <sub>oTS</sub> [mg/L]	CSB <sub>TS</sub> [mg/L]	oTS o. AFS [g/L]	KN/oTS [g/g]	CSB/oTS [g/g]	Leg. spp. [KBE <sub>eq</sub> /ml]
a. Industrie	69	1796	0,51	0,14	3,52	<400
b. Industrie mit UV	65	1853	0,47	0,14	3,94	<400
c. Ablauf Kanal	2	26	0,02	0,14	1,63	<400
d. Belebtschlamm	213	3733,3	2,91	0,07	1,28	1,08·10 <sup>5</sup>

Literatur Belebtschlamm:

- 60-80% org. Anteil (Kohlenhydrate, Fette und Proteine) (Mudrack & Kunst, 1994)
- 7-9% Fette (Koppe & Stozek, 1999)
- Proteine 900-1300 mg/L → 0,9 – 1,3 g/L (Koppe & Stozek, 1999)

Tabelle 2: CSB und KN von org. Stoffen zur Identifikation von wachstumsfördernden Substraten.

Tabelle 1 zusammengefasst, wobei nur die offensichtlich relevanten Top 5 aufgeführt sind.

Darüber hinaus wurden die Verhältnisse vom CSB zu den organischen Stoffen sowie vom Kjeldahl Stickstoff zu den organischen Stoffen als möglicher Indikator für geeignete Substrate untersucht. Aus den wenigen – noch nicht statistisch abgesicherten Werten – geht hervor, dass geeignete Substrate offensichtlich ein KN/oTS von deutlich > 0,1 und ein CSB/oTS von deutlich > 2 haben (s. Tabelle 2)

### **Biologische, chemische und physikalische Eliminationsverfahren – Praxis- und Laborerfahrungen**

Auf der Kläranlage Warstein wurden vom Ruhrverband Anfang September 2013 folgende Sofortmaßnahmen erfolgreich umgesetzt:

- Außerbetriebnahme des Tropfkörpers
- Außerbetriebnahme der Kreiselbelüfter in der Nitrifikation
- Installation einer Reinsauerstoffversorgung in der Nitrifikation (i.w. zur Verringerung der Gaseintragsmengen im Belebungsbecken und damit der Aerosolbildung sowie zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung)
- Abdeckung der Nitrifikation (Aerosolunterbindung)
- Installation einer mobilen UV-Anlage zur Desinfektion des Ablaufs der Kläranlage

Hiermit wurden sämtliche denkbaren Expositionspfade (Luft, Wasser) vorsorglich unterbrochen.

Es folgte Anfang Oktober 2013 die Installation einer zusätzlichen chemischen Desinfektion mit Hilfe von Perameisensäure. Mit Hilfe der genannten Kombination von Desinfektionsverfahren konnte ab dem 04.10.2013 die Legionellenkonzentration im Ablauf der Kläranlage gegenüber der Legionellenkonzentration im Zulauf stark reduziert werden.

Im Laboransatz wurde als biologisches Verfahren zur Elimination von Legionellen die Absenkung des Schlammalters unter die Verdopplungszeit der Legionellen untersucht. Da Legionellen im warmen Abwasser sehr hohe Wachstumsraten aufweisen, würde diese Maßnahme eine ordnungsgemäße Abwasserreinigung mit Nitrifikation ausschließen. Aus diesem Grund wird diese Maßnahme als praxisuntauglich eingestuft.

Der Einsatz von chemischen Desinfektionsverfahren im Belebtschlamm mit Mikrosilber, Ozon, Wasserstoffperoxid, Chlordioxid oder Alkalisierung im Labormaßstab stellte sich ebenfalls als ungeeignet heraus. Die Wirkung der Chemikalien war zu unspezifisch für Legionellen und wirkte sich negativ auf die gesamte Belebtschlammbiozönose (insbesondere auf die Nitrifikanten) aus. Im Ablauf der Kläranlage hingegen war der Einsatz von Perameisensäure in Kombination mit UV-Licht auf der KA Warstein erfolgreich.

Da *L. pneumophila* bei Temperaturen über 22°C Wachstumsvorteile hat, könnte eine Abkühlung der Temperatur im Zulauf der Kläranlage erfolgversprechend nur auf die Vermehrung von Legionellen in der Anlage selbst sein. In der Praxis der kommunalen Abwasserbehandlung wird dies aus energetischen Gründen – wenn nicht mit Wärmerückgewinnung gearbeitet werden kann – kaum umsetzbar sein. Die Laborversuchsergebnisse zeigen allerdings auch, dass bei Temperaturen von 26°C eine Stagnation von *L. pneumophila* auftreten kann; insofern wäre die Ermittlung des exakten Schwellenwertes, bei dem ein verstärktes Wachstum von *L. pneumophila* auftritt, von erheblicher Bedeutung.

Als physikalisches Eliminationsverfahren wurde eine Teilstrombehandlung mit Ultraschall zur Abreicherung des Wirtes (Nacktamöben) untersucht. Wie in Abb. 5 dargestellt, werden die trophozoiten Nacktamöben (anders als die Legionellen) zwar durch den Ultraschall vollständig zerstört, können aber innerhalb kürzester Zeit den Schlamm wiederbesiedeln. Nach 6 Tagen ist kaum noch ein Unterschied zum unbehandelten Schlamm erkennbar. Auf die Legionellen hat die Behandlung bei der eingesetzten Energie überhaupt keinen Einfluss, so dass Ultraschall keine langfristige Strategie zur Abreicherung von Legionellen darstellt.

### **Elimination durch Substratveränderung und verfahrenstechnische Veränderungen**

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass proteinreiches Substrat neben der Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung von *L. pneumophila*

hat. Ein weitgehender Rückhalt von proteinreichem Substrat bzw. der Vorabbau kann hier eventuell Abhilfe hinsichtlich des Legionellenaufkommens schaffen. Als Verfahrenskombination kann daher bei hoher Temperatur und Konzentration des Abwassers eine anaerobe Vorbehandlung hilfreich sein. In dieser Stufe werden die Proteine hydrolysiert, womit vermutlich eine Abreicherung der spezifischen Substrate für Legionellen erfolgt. In einer nachgeschalteten Schwachlaststufe zur Stickstoffelimination könnte dann für Legionellen kein Wachstumsvorteil mehr vorhanden sein und Nitrifikanten können in Abhängigkeit vom Schlammalter gehalten werden. Zur weiteren Aufklärung dieser Möglichkeiten besteht Forschungsbedarf.

Mögliche Indikatorparameter (z.B. CSB/oTS, KN/oTS, bestimmte Aminosäuren) sollten zur Erkennung von geeigneten Nährsubstraten und zur Früherkennung von möglichem verstärktem Legionellenwachstum ebenfalls untersucht werden.

Die bisherigen Erkenntnisse aus den Laborversuchen aber auch von der Kläranlage selbst machen deutlich, dass es keine einfachen Abreicherungsstrategien für Legionellen in Kläranlagen gibt, außer einer Einflussnahme auf die Substratzusammensetzung und die Temperatur.

Aus diesem Grund sollte u.a. der Temperatureinfluss zwischen 22°C und 30°C weiter untersucht werden. Die Schwerpunkte der Untersuchungen sollten sich auf die Identifikation der bevorzugten Randbedingungen zur Legionellenvermehrung konzentrieren. Die wichtigsten Einflussgrößen sind hierbei:

- die Aminosäurenverfügbarkeit,
- die vermehrungs- (>22°C) bzw. abreicherungsrelevanten (15°C–22°C) Temperaturbereiche für verschiedene Spezies,
- die Substratabhängigkeit (z.B. Proteine, Pilze, Hefen, Lignin) bzw. Substratveränderung (anaerobe Vorbehandlung) und
- die Identifikation von möglichen Indikatorparametern (z.B. Verhältnis von CSB/oTS und N/oTS, spezielle Aminosäuren).

Aus wissenschaftlicher Sicht ist ebenfalls der Einfluss von extrazellulären inhibitorisch wirksamen Substanzen anderer Bakterien (z.B. *Aeromonas hydrophila*) auf das Wachstum von *L. pneumophila* und der substratabhängige Konkurrenzdruck unter den Bakterien wichtig, um die Abreicherungsmechanismen im belebten Schlamm und Störungen beim Nachweis besser nachvollziehen zu können. Darüber hinaus ist die Identifizierung und Charakterisierung des Verhaltens der wichtigsten Legionellenwirte im Belebtschlamm (Nacktamoeben und/oder Ciliaten) noch nicht ausreichend untersucht worden. Insbesondere sind dabei die bevorzugten Lebensbedingungen zur Vermehrung von Bedeutung.

Hinsichtlich des Nachweismethoden wird empfohlen, bei Verdacht oder Nachweis von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* in Kläranlagen zur weiterentwickelten Standardmethode (Kulturverfahren) zusätzlich mittels qPCR ein ganzheitlicheres Bild des Belebtschlammes zu erhalten, um gezielte weitere Maßnahmen ergreifen zu können. Durch die Erfahrungen, die mit dem Ausbruch in Warstein gesammelt werden konnten, haben sich einige Sofortmaßnahmen als empfehlenswert herausgestellt. Zu allererst sollte bei positivem *L. pneumophila*-Befund jeglicher Aerosolaustrag möglichst vermieden werden, beispielsweise durch das Abdecken von Belebungsbecken, den Einsatz von Reinsauerstoff zur Begasung sowie ggf. einer Abluftbehandlung. Wenn gesundheitsgefährdend hohe Konzentrationen im Gewässer zu erwarten ist, sollte der Ablaufes der Kläranlage mit Hilfe UV oder chemisch desinfiziert werden, vor allem dann, wenn unterhalb der Ablaufes eine Wasserentnahme für Rückkühlwerke erfolgt oder sonstige sensible Nutzungen bestehen. Dadurch wird die Gefahr einer Weiterverbreitung der Legionellen vermindert. Auf der Anlage selbst muss das Personal in Bereichen mit hohen Aerosolbelastungen sich mit einem geeigneten Mundschutz (z.B. Schutzklasse FFP3) vor einer Infektion schützen.

### Danksagung

Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung des „Virenprojektes“ und bei dem Ministerium für Klimaschutz, Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (MKULNV NRW) für die Förderung des „Legionellenprojektes“.

### IV. Literatur

- [1] FRASER, D.W. et al. (1977): Legionnaires'-disease. – New England Journal of Medicine. **297**(22): 1189–1197.
- [2] PERCIVAL, S.L. & D.W. WILLIAMS (2014): Chapter Eight – Legionella, in Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition). – Academic Press: London. p. 155–175.
- [3] GEORGE, J.R. et al. (1980) : Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. – J. Clin. Microbiol., **11**(3): 286–291.
- [4] FIELDS, B.S., R.F. BENSON & R.E. BESSER (2002): Legionella and Legionnaires'-disease: 25 Years of Investigation. – Clinical Microbiology Reviews. **15**(3): 506–526.
- [5] DECLERCK, P. et al. (2010): , Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. – Water Research. **44**(3): 703–710.

- [6] GARCIA, M.T. et al. (2007): *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. – *Environ Microbiol* **9**(5): 1267–1277.
- [7] KUIPER, M.W. et al. (2004): Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. – *Appl Environ Microbiol.* **70**(11): 6826–6833.
- [8] NEWSOME, A.L. et al. (1985): Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. – *Infect Immun* **50**(2): 449–452.
- [9] BARKER, J., H. SCAIFE & M.R. BROWN (1995): Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. – *Antimicrob Agents Chemother* **39**(12): 2684–2688.
- [10] ULLERYD, P., et al. (2012): Legionnaires' disease from a cooling tower in a community outbreak in Lidköping, Sweden- epidemiological, environmental and microbiological investigation supported by meteorological modelling. – *BMC Infect Dis.* **12**: 313.
- [11] BEAUTE, J., P. ZUCS & B. DE JONG (2009–2010): Legionnaires disease in Europe. – *Euro Surveill.* **18**(10): 20417.
- [12] DVGW, DVGW-Arbeitsblatt W 551 (2004): "Trinkwassererwärmungs- und Trinkwasserleitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums; Planung, Errichtung, Betrieb und Sanierung von Trinkwasser-Installationen".
- [13] TrinkwV (2001): Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch - in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. August 2013 (BGBl. I S. 2977).
- [14] KUSNETSOV, J. et al. (2010): Two Legionnaires' disease cases associated with industrial waste water treatment plants: a case report. – *BMC Infect Dis.* **10**: 343.
- [15] NGUYEN, T.M. et al. (2006): A community-wide outbreak of legionnaire's disease linked to industrial cooling towers - how far can contaminated aerosols spread? – *J Infect Dis.* **193**(1): 102–111.
- [16] GREGERSEN, P. et al. (1999): Pontiac fever at a sewage treatment plant in the food industry. – *Scand J Work Environ Health* **25**(3): 291–295.
- [17] EIKMANN, T., I. TESSERAUX & C. HERR (2013): Hilft der Legionellen-Ausbruch in Warstein endlich, die notwendigen (umwelthygienischen) Konsequenzen zu ziehen? – *Umweltmedizin - Hygiene - Arbeitsmedizin* **18**(6): 301–302.
- [18] TOZE, S. et al. (1994): The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. – *Journal of Applied Bacteriology* **77**(2): 169–174.
- [19] ROSENWINKEL, K.-H. et al. (2014): Abschlußbericht Ruhrverband/MKULNV NRW "Entwicklung von Maßnahmen zur Reduzierung von Legionellen in belebtem Schlamm".
- [20] K.-H. ROSENWINKEL, R. NOGUEIRA & K. SCHNEIDER (2015): Legionellenbe-

lastung im Abwasser Vorkommen und Maßnahmen zur Reduzierung, Vortrag Essener Tagung Aachen 03/2015.

- [21] ROSENWINKEL, K.-H., R. NOGUEIRA & K. SCHNEIDER (2015): Legionellen im Abwasser Vorkommen und Maßnahmen zur Reduzierung, Vortrag IFWW Wasserwerk Haltern 05/2015.
- [22] KATHARINA SCHNEIDER, KAI-UWE UTECHT, REGINA NOGUEIRA & KARL-HEINZ ROSENWINKEL (2015): Legionellenbelastung im Abwasser - Vorkommen und Maßnahmen zur Reduzierung, Korrespondenz Abwasser 06/2015.
- [23] NOGUEIRA, R., M. EXNER, T. GRÜNEBAUM, W. VERSTRAETE & K.-H. ROSENWINKEL (2015): Strategies for the Reduction of Legionella in Biological Treatment Systems, Conference paper, IWA LWWTP's conference Prag 09/2015.
- [24] SZEWZYK R., J.M. LOPEZ-PILA & I. FEUERPFIL (2006): Entfernung von Viren bei der Trinkwasseraufbereitung – Möglichkeiten einer Risikoabschätzung. – Bundesgesundheitsblatt **49**:159–162.